

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

自然毒等のリスク管理のための研究

—国際的に妥当性が評価された LC/MS/MS 法による国内貝毒検査法の確立—

研究分担者	渡邊龍一	水産技術研究所	主任研究員
	内田 肇	水産技術研究所	研究員
	松嶋良次	水産技術研究所	安全管理グループ長
	鈴木敏之	水産技術研究所	環境・応用部門長

要旨： 国際的に妥当性が評価された、親水性相互作用カラムを用いた液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法（HILIC-MS/MS）を用いて、産業上重要な水産物であるホタテガイを分析し、マウスを用いた動物試験法（MBA）との相関性（88 検体）を調べた。その結果、MBA の結果に対し、HILIC-MS/MS 法の結果は半分程度（近似曲線の傾き：0.42）の毒力を示した。その傾向は高毒力の試料ほど顕著であった。決定係数は 0.72 と正の相関を示した。こうした毒力の乖離要因として、二枚貝代謝物 M-toxins の影響（毒性は未解明）が考えられた。分析に必要な標準品は現在市販されている 16 成分のうち、dcNEO、C3/C4 を除いた 13 成分は必ず必要であることが判明した。化学兵器であるサキシトキシン（STX）を分析する際に標準品が必要かどうか検証するため、その組成比、毒力比を調べた。毒組成では 4.0-47.4 % の範囲で、毒力比では 6.0-58.5 % を占めており、STX 標準品を用いて正確に定量する必要があることが明らかになった。最後に、ホタテガイ中腸腺からテトロドトキシン（TTX）を検出したが、その毒力は最大でも可食部で 0.005 MU/g と非常に低いものであった。既報ではホタテガイのほかにアカザラガイが著量の TTX（～4.0 MU/g）を持つことが報告されており、さらなる調査が必要であることが判明した。

A. 研究目的

ホタテガイをはじめとする二枚貝は、生息海域に発生する、麻痺性貝毒を生産する有毒プランクトンを摂取することで毒化する。日本では、生産海域に発生する有毒プランクトンをモニタリングしており、その発生を確認し、細胞密度などから監視強化に移行するなどの措置をとっている。麻痺性貝毒の検査は、公定法としてマウス毒性試験が用いら

れており、二枚貝に含まれる麻痺性貝毒の規制値は、4 MU/g（0.8 mg STX·2HCl eq./kg 相当）と定められている。近年、二枚貝に含まれる麻痺性貝毒を正確に定量できる手法が開発され、国際的に妥当性確認のとれた分析法（親水性相互作用カラムを用いた液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法：HILIC-MS/MS）が報告されている。本研究班の課題担当グループもこの妥当性確認試

験に参画した。また欧州連合 (EU) では 2019 年 1 月から動物試験を廃止し、機器分析法に移行しており、2020 年 10 月に EU 向け二枚貝輸出において機器分析を使用するよう通知 (SPS 通報) がなされ、2021 年 10 月から施行されている。このように、国際的に機器分析への移行が主流になりつつある。そこで本事業では、機器分析法を国内で普及させていくために不可欠な要因を精査した。

検査対象とすべき成分として、50 成分以上ある麻痺性貝毒類縁体のうち、Oshima により主要成分とされている 15 標準物質を用いた分析例では、マウス毒力と正の高い相関が報告されている。

化学兵器に指定されているサキシトキシン (STX) の標準物質については、ホタテガイなどに含まれる STX の毒組成と毒力に占める割合を明らかにすることにより、標準物質として使用する必要性について検証することが求められている。

フグ毒として知られるテトロドトキシン (TTX) は、近年、二枚貝から検出される事例が西欧を中心に報告されている。EFSA におけるリスク管理では、食品中の TTX の許容量として、44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を基準値として設定している。一方、二枚貝の麻痺性貝毒の基準値は 0.8 mg STX \cdot 2HCl eq./kg と定められており、この基準値に TTX を含めるか否かについて検討する必要がある。日本では、フグ毒 TTX を扱う際には、10 MU/g (2.2 mg/kg 相当) を規制値として定めている。一方で、国内産ホタテガイやアカザラガ

イから TTX が検出されており、後者の場合は最大で 9 mg/kg-中腸腺 (可食部換算で約 4 MU/g) にも達しており、その毒力は無視できない。現在のマウス毒性試験では塩酸抽出によってある程度 TTX も抽出され、毒性評価がなされている状況と考えられる。二枚貝中の TTX の存在が明らかになっている現状において、麻痺性貝毒の機器分析検査の際に、二枚貝中の TTX をどのように扱うかについて検討する必要がある。

以上の背景から、北海道・東北地方のホタテガイを試料として、機器分析法 (HILIC-MS/MS) とマウス毒性試験における毒力の相関を調べることを目的とする。そこで相関性が得られない場合、その原因を精査する。また、化学兵器である STX の毒力および毒組成それぞれに占める割合を求め、標準物質が必要かどうか明らかにする。更に、ホタテガイに含まれる TTX 含量を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ホタテガイの主要な生産海域である北海道及び東北地方の本二枚貝について、マウス毒性試験 (MBA) と HILIC-MS/MS による分析を行い、両者の相関性を明らかにする。各成分の総毒力に対する寄与度から国内で入手可能な標準品について必要性を検証する。また、化学兵器であるサキシトキシン (STX) については、二枚貝における毒組成に占める割合および毒力に占める割合をそれぞれ求め、STX 標準品が必要かどうか検証する。さらには、ホタテガイに含ま

れるテトロドトキシン(TTX)について、その含量から規制対象とすべきか検証する。

MBA と HILIC-MS/MS に供するホタテガイホモジネートは、日本食品検査でホモジネートを調製後、一部を MBA に使用し、一部を HILIC-MS/MS に使用した。試料は、ホタテガイ可食部全体あるいは中腸腺とした。HILIC-MS/MS 分析に資するホタテガイ試料は、*J. Chromatogr. A* 1387 (2015) p1-12 に従い、抽出・前処理を行った。HILIC-MS/MS 分析は、先述の論文を参考に、水産技術研究所所有の質量分析装置を最適化した方法で行った。分析に用いた標準物質は、カナダの NRC 製認証標準物質 14 成分 (C1/2, GTX1-6, dcGTX2/3, NEO, dcNEO, dcSTX, TTX) を用いた。dcGTX1/4 はニュージーランドのコースロン研究所から恵与されたものを用いた。それらは段階的希釈列を作製し、5-7 点のポイントを使い検量線を作成した。STX は当所所有のものを用いた。C3/4 は選択的反応モニタリング (SRM) トランジションを設定し、定性検出を可能とした。二枚貝代謝物である M-toxins は、既存の SRM トランジションで概ね検出できるため、分析時に特段設定せず、データ解析ソフトウェアにて適宜処理した。HILIC-MS/MS で分析すると試料に含まれる麻痺性貝毒成分の毒濃度 (nmol/g) が得られるため、それに Oshima (1995) によって算出されたモル毒力 (MU/μmol) を乗じることで、マウス毒力 (MU/g) に換算した。また、MBA に供するホタテガイ試料は、食品衛生検査

指針に記載されている麻痺性貝毒検査法 (公定法) に従って調製した。

* Oshima, *J. AOAC int.* (1995) 78, p528.

C. 研究結果と考察

北海道・東北地方の二枚貝を分析した結果、北海道と東北地方で相関性データ等に大きな違いは見られなかったため、データ解析では一緒に処理した。必要に応じてデータの一部を北海道のみ、あるいは東北地方のみとして、報告する。

2021 年度は北海道・東北地方のホタテガイ計 88 検体を分析した。MBA による毒力は、2.0 MU/g-180 MU/g までの範囲であった。それらについて得られた MBA 毒力と HILIC-MS/MS から換算したマウス毒力との相関を調べた (図 1)。その結果、近似曲線の傾きは 0.42 となり、MBA の方が HILIC-MS/MS の分析値よりも 2 倍近く高いマウス毒力を示した。決定係数は 0.72 であった。北海道や東北地方のホタテガイでは可食部を用いた場合は 4 MU/g を規制値、2.0 MU/g を監視強化として扱っている場合があるが、可食部に占める中腸腺の割合は 10% 程度のため、中腸腺を使用した分析では 20 MU/g で監視強化、40 MU/g で規制値付近となる。そこで、より監視強化および規制値に近いマウス毒力の範囲 (0 MU/g- 45 MU/g) で近似曲線を作成したところ、傾きは 0.52 (決定係数: 0.65) とやや改善したものの、やはり MBA の毒力が HILIC-MS/MS の分析結果の 2 倍程度であることには変わりなかった。MBA と HILIC-MS/MS の結果を、毒力を軸にプロットした図を示す

(図2)。5 MU/g 付近までは MBA と同程度の値を示すものの、それ以上の高毒力になると MBA の方が HILIC-MS/MS よりも高い結果となった。試料を HILIC-MS/MS で分析していると、GTX6 の溶出後から STX 群が溶出するまでの保持時間に、二枚貝代謝物である M-toxins と推定されるピークが複数検出された(図3)。検出した成分は、M1, M3, M5-HA, M4, M10 であった。このうち確実に同定できたのは、M1, M3, M5-HA の3成分であり、M4, M10 は推定成分である。二枚貝代謝物である M-toxins については、STX を基準とした毒性等価係数は不明であり、かつ、認証標準物質が市販されていないため、その濃度および毒力を算出することはできない。そこで、M-toxins (M1, M3, M5-HA, M4) のピーク面積と MBA 毒力との間に相関性がみられるかどうか調べたところ、近似曲線の決定係数は 0.91 と非常に高い正の相関を示した(図4)。このことは、MBA 毒力が高いほど、M-toxins のピーク面積が大きくなっており、それら成分濃度が高い、あるいは毒力への寄与があることを示唆している。従って、MBA と HILIC-MS/MS の分析結果が乖離している理由として、二枚貝代謝物 M-toxins の影響が推測された。MBA 毒力に対して、M-toxins の関与が相当量認められる場合、これら成分についても機器分析の際には認証標準物質が必要になる。

化学兵器である STX を分析に使用する場合、経済産業省への使用許可申請が必要となる。そこで、STX を分析用標準品として扱う必要があるかどうか、ホタ

テガイにおける毒組成と毒力に占める割合を調べ、検証することとした。東北地方のホタテガイを分析した結果では、毒組成に占める STX の割合は 4.0% - 47.4% (平均: 16.3%) の範囲であり、毒力に占める STX の割合は 6.0% - 58.5% (平均: 24.7%) であった。北海道でも同様の傾向にあった。このことから、STX の占める割合が高い試料も存在するため、他の毒による代替検量線を使用した定量測定は不確実といえる。従って、STX の標準物質を使い、正確に定量する必要があることが判明した。

ホタテガイに含まれる TTX 量を調べた結果、可食部試料からは TTX が検出されなかったが、中腸腺試料からは微量ながら TTX を検出した。マウス単位に換算したところ、中腸腺 1g 当たり、0.1 MU にも達していなかった。このことから、北海道・東北地方のホタテガイについては TTX 量の年変動や季節変動も考えられるが、本結果においては TTX の寄与率は低いと言える。ただし、アカザラガイのように極端に高い毒力を持つ場合もあるので、貝種についてはさらなる精査が必要である。

D. 結論

北海道・東北地方のホタテガイ 88 検体を HILIC-MS/MS で分析し、MBA によって求めた毒力と相関性を調べた。その結果、HILIC-MS/MS で求めた換算毒力は MBA で求めた毒力の半分程度であった。両手法の検査結果が乖離した要因として、二枚貝代謝物である M-toxins の影響が考えられた。実際、M-toxins の

ピーク面積と MBA 毒力との間に正の相関が見られる。M-toxins の毒性等価係数 (TEF) は低いと推定されているが、M-toxins の毒力の影響についても検証する必要がある。

化学兵器である STX の取り扱いについては、それが毒組成や毒力組成に占める割合が高い (~50%) ため、代替検量線を用いるよりも STX そのものを用いて定量した方が良いと考えられる。

最後に、北海道・東北地方のホタテガイに含まれる TTX 含量は非常に少なく、0.1 MU/g にも満たないことから、その全体の毒力に占める割合は軽微なものと考えられる。しかし、貝種によっては著量の TTX を含む場合もあるので、貝

種の違いを調べることは今後の検討課題である。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表
なし

G. 学会発表
なし

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

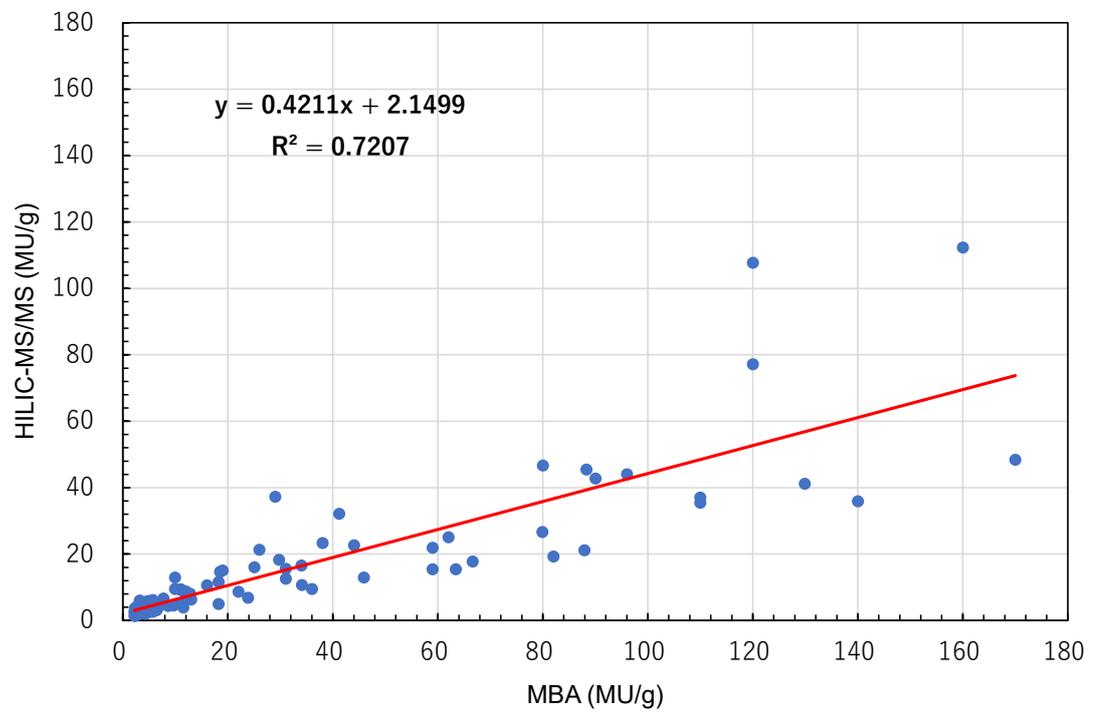


図1 北海道・東北産ホタテガイにおけるマウス毒性試験と機器分析法との相関

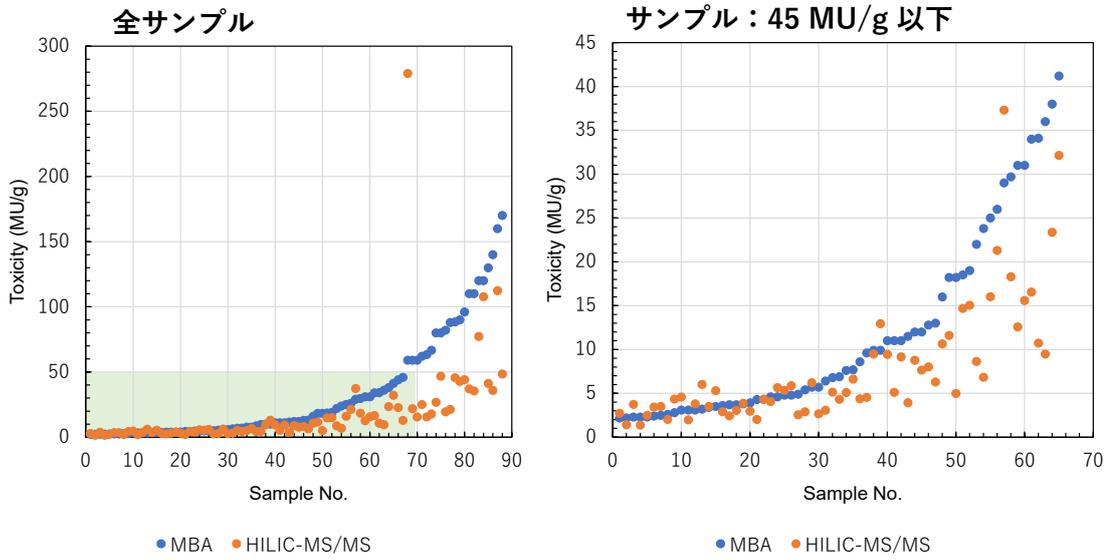


図2 北海道・東北産ホタテガイにおけるマウス毒性試験と機器分析法との相関
 (左) 全サンプルを使用した時の散布図、(右) 45 MU/g 以下のサンプルにおける散布図

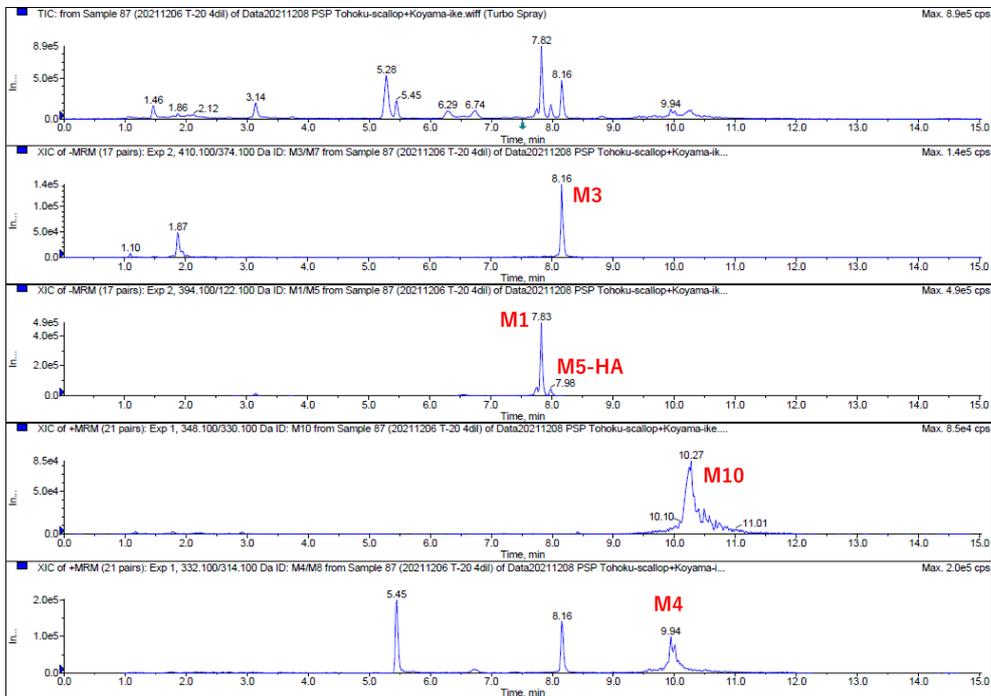
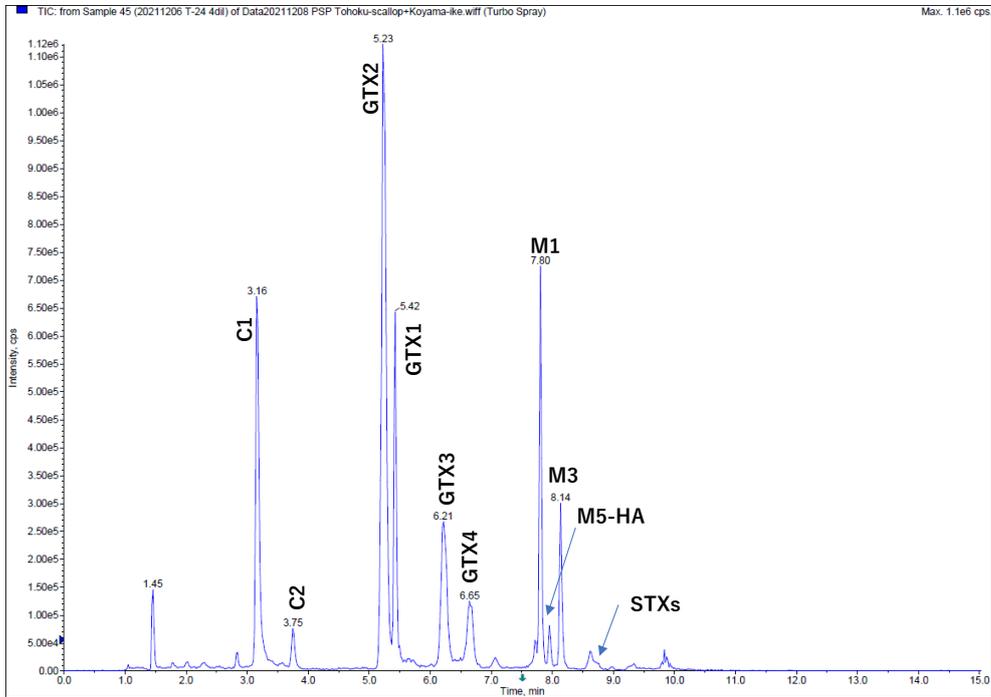


図3 東北産ホタテガイで検出した二枚貝代謝物 M-toxins のクロマトグラム (上段) トータルイオンクロマトグラム (下段) 抽出イオンクロマトグラム

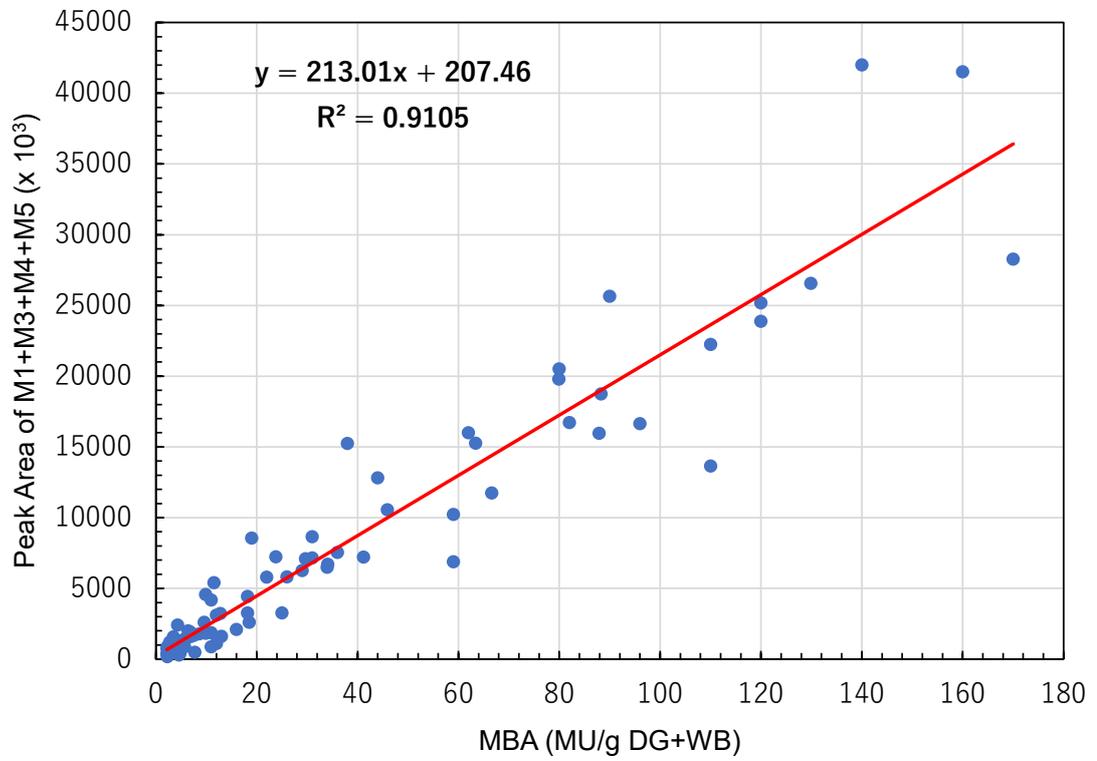


図4 北海道・東北産ホタテガイにおけるマウス毒性試験と二枚貝代謝物 M-toxins との
 相関